



Title	Molecular cloning and nucleotide sequencing of the Arthrobacter dextranase gene and its expression in Escherichia coli and Streptococcus sanguis
Author(s)	奥島, 実
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37864
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	おく	しま	みのる
博士の専攻分野 の名称	奥	島	実
学位記番号	第	9941	号
学位授与年月日	平成3年11月7日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文名	Molecular cloning and nucleotide sequencing of the <i>Arthrobacter</i> dextranase gene and its expression in <i>Escherichia coli</i> and <i>Streptococcus sanguis</i> (アルスロバクター属細菌のデキストラナーゼ遺伝子のクローニン グ、塩基配列の決定と大腸菌及びストレプトコッカス・サンギス におけるその発現)		
論文審査委員	(主査) 教授	松代 愛三	
	(副査) 教授	中田 篤男	教授 岡山 博人

論文内容の要旨

〔目的〕

う蝕の原因となる歯垢の分解除去に dextranase が極めて有効であることが知られている。この作用は、dextranase がう蝕の原因菌と考えられる *Streptococcus mutans* が産生し、歯垢の主要構成成分となる不溶性グルカン (α -1,3-1,6 glucan) を効率よく分解することによっている。しかし、従来の dextranase そのものを口腔内に投与する方法では、唾液により投与された dextranase はすぐに希釈され、また洗い流されてしまい、その効果を口腔内において継続的に発揮させることは困難であった。本研究は、このような従来法の欠点を解消する手段として、dextranase gene を cloning した口腔内常在細菌を作製し、これを用いて口腔内において永続する dextranase 発現系を構築するという、新しいう蝕予防法の開発を目的として始められた。

〔方法ならびに成績〕

dextranase 活性検出用の blue dextran において顕著にハローを形成し、不溶性グルカンをよく分解資化する *Arthrobacter* 属に属する細菌 (CB-8 菌) を土壤中より分離した。そして、この菌の産生する dextranase を単一にまで精製し、N末端アミノ酸配列や、その他の種々の酵素的な性質を調べた。この酵素は endo-type に dextran を分解し、また口腔内に似た環境 (中性-弱酸性 pH, 37度) において dextran をよく分解した。一方、CB-8 菌の全DNAを抽出し、pUC19を用いて *Escherichia coli* (HB101 株) に shotgun cloning を試みた。dextranase 活性を発現し、blue dextran plate においてハローを形成するようになった transformant 3 株を分離し、それぞれの株が保持する plasmid

(pDEX011) を作製し、CB-8 菌由来の部分の DNA の塩基配列の決定を行った結果、CB-8 菌の dextranase 遺伝子が 1920bp の ORF を持つことが明らかとなり、また、dextranase protein は、CB-8 菌において 640 個のアミノ酸残基からなる前駆体として合成され、signal peptide と考えられる N 末端の 49 アミノ酸残基が切断されて、菌体外に分泌されると推定された。pDEX001 及び pDEX011 を保持した *E. coli* transformant において発現した dextranase は、どちらの場合でも、そのほとんどが活性を保持した状態で periplasm に分泌されていた。dextranase gene の塩基配列が明らかとなったため、口腔内常在細菌である *Streptococcus sanguis* と *E. coli* との shuttle vector であり、かつ dextranase gene、*S. mutans* 由来の glucosyltransferase の promoter (*gtfB*)、rrnBT₁T₂ terminator をもつ dextranase の expression vector でもある pMNK-1 を構築し、これを用いて *E. coli* 及び *S. sanguis* の形質転換を行った。*E. coli* transformant においては活性を保持した dextranase protein の periplasm への分泌が確認された。一方、*S. sanguis* transformant においては、活性を保持した dextranase は発現していたが、菌体外への分泌は認めることができなかった。

〔総括〕

前記の目的を達成するために口腔内でよく歯垢を分解すると考えられる dextranase の生産菌を分離し、dextranase gene の塩基配列を決定した。そして、この遺伝子を口腔内常在細菌である *S. sanguis* に cloning し、活性を保持した dextranase protein を発現させることに成功した。本研究においては、*S. sanguis* において、dextranase を菌体外に分泌させることには成功しなかったが、今後、菌体外分泌に有効と思われる signal peptide、さらにより強力な promoter を用いて、より多量の dextranase を菌体外に分泌させるような plasmid の構築を行いたいと考えている。また、*in vitro* また *in vivo* において、dextranase を発現するようになった *S. sanguis* transformant が歯垢の分解除去、そして、虫歯予防にどの程度有効であるのか調べていきたいと考えている。

論文内容の結果の要旨

本研究は、虫歯菌 (*Streptococcus mutans*) が口腔内において蔗糖を原料として合成し、虫歯の原因となる不溶性グルカン (α -1,3-1,6 glucan) を効率よく分解する dextranase を産生する細菌 (*Arthrobacter sp.* CB-8) を土壤中より分離した。この細菌の産生する dextranase を精製して、種々の酵素学的な性質を明らかにしている。また一方 dextranase 遺伝子を大腸菌にクローニングし、大腸菌においては、ペリプラズム画分に活性を保持した dextranase が分泌されるようになることを示した。そして、dextranase 遺伝子 DNA の塩基配列を決定して、この遺伝子を口腔内常在細菌である *Streptococcus sanguis* に shuttle-expression vector を作製することにより導入し、*Streptococcus sanguis* において活性を保持した dextranase を発現させることに成功している。これらの研究成果は、口腔内常在細菌を用い、口腔内で長時間持続する全く新しい虫歯予防法の開発に直接つながるもので、その内容は学位論文として充分価値のあるものと認められる。